

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Zuzana Okál'ová

# STANOVENÍ PERFLUOROVANÝCH ORGANICKÝCH KYSELIN V ODPADNÍCH VODÁCH METODOU GC - MS

Determination of Perfluorinated Organic Acids  
in Sewage Water by GC - MS Method

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Praha 2012

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 24. května 2012.

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli RNDr. Radomírovi Čabalovi, Dr. za odborné vedení a cenné připomínky k mé práci a dále pak i kolegům v laboratoři.

V neposlední řadě patří mé poděkování také rodičům, kteří mi umožnili studium na vysoké škole, a mým přátelům za všestrannou podporu.

## Obsah

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>- 7 -</b>
1.1 Cíl práce.....	- 7 -
<b>2. TEORETICKÝ ÚVOD .....</b>	<b>- 8 -</b>
2.1 Chemická struktura.....	- 8 -
2.2 Průmyslové využití .....	- 9 -
2.3 Zdroje a výskyt v životním prostředí.....	- 9 -
2.4 Vliv na živé organismy a životní prostředí .....	- 10 -
2.5 Stanovení v odpadních vodách.....	- 11 -
2.5.1 Evropa.....	- 12 -
2.5.2 Severní Amerika .....	- 12 -
2.5.3 Asie .....	- 14 -
2.6 Stanovení pomocí GC-NCI-MS .....	- 14 -
2.7 Proces derivatizace .....	- 15 -
2.8 Kontaminace slepých vzorků .....	- 15 -
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>- 16 -</b>
3.1 Reagencie a standardy .....	- 16 -
3.2 Přístroje a zařízení .....	- 16 -
3.3 Pracovní postup .....	- 17 -
3.3.1 Filtrace .....	- 17 -
3.3.2 SPE prekoncentrace .....	- 18 -
3.3.3 Derivatizace .....	- 19 -
3.3.4 Kalibrační závislosti .....	- 19 -
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>- 20 -</b>
4.1 Vyhodnocení kalibračních závislostí.....	- 20 -
4.2 Účinnost SPE prekoncentrace .....	- 23 -
4.3 Stanovení LOD a LOQ .....	- 24 -
4.4 Vyhodnocení reálných vzorků.....	- 26 -
<b>5. ZÁVĚR.....</b>	<b>- 28 -</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>- 29 -</b>

## Seznam použitých zkratk

$c$	hmotnostní koncentrace [ $\text{g L}^{-1}$ ]
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
FTOHs	fluorotelomerní alkoholy
GC-NCI-MS	plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie s negativní chemickou ionizací
GC-EI-MS	plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
PFASs	perfluorované alkylové sloučeniny
PFCs	perfluorované sloučeniny
PFCAs	perfluorované karboxylové kyseliny
PFPeA	perfluoropentanová kyselina
PFHxA	perfluorohexanová kyselina
PFHpA	perfluoroheptanová kyselina
PFOA	perfluorooktanová kyselina
PFNA	perfluorononanová kyselina
PFDA	perfluorodekanová kyselina
PFUnA	perfluoroundekanová kyselina
PFDoA	perfluorododekanová kyselina
PFOS	perfluorooktanosulfonát
PFSA	perfluorované sulfonové kyseliny
PTFE	polytetrafluorethylen
RSD	relativní směrodatná odchylka
SIM	monitorování vybraných iontů (selected ion monitoring)
S/N	poměr signálu a šumu
SPE	extrakce tuhou fází
$t_R$	retenční čas [min]
TBABr	tetrabutylammonium bromid
TOF	průletový analyzátor (time of flight)

### **Předmětová hesla:**

Analytická chemie

Separační metody

Plynová chromatografie

### **Klíčová slova:**

Plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie s negativní chemickou ionizací

Odpadní voda

Perfluorované karboxylové kyseliny

---

### **Objective words:**

Analytical chemistry

Separation methods

Gas chromatography

### **Keywords:**

Gas chromatography-mass spectrometry with negative chemical ionization

Sewage water

Perfluorinated carboxylic acids

# 1. Úvod

## 1.1 Cíl práce

V posledním desetiletí bylo vyvinuto značné úsilí na stanovení perfluorovaných sloučenin (PFCs) v životním prostředí, zejména perfluorovaných karboxylových kyselin (PFCAs) a perfluorovaných sulfonových kyselin (PFSAAs). Navzdory existenci studií pojednávajících o výskytu PFCs v biologických matricích, pořád málo studií věnuje pozornost přítomnosti PFCs v abiotických matricích jako je vzduch a voda.

Za jeden z hlavních zdrojů kontaminace vodního prostředí PFCs jsou považovány čističky odpadních vod. Právě odtoková voda častokrát obsahuje vyšší koncentrace PFCs, zejména perfluorooktanové kyseliny (PFOA) a perfluorooktanosulfonátu (PFOS), v porovnání s koncentracemi stanovenými v přítokové vodě.

Analýzy perfluorovaných sloučenin ve vodných vzorcích vyžadují citlivé a přesné metody z důvodu výskytu těchto sloučenin v koncentračním rozmezí  $\text{pg L}^{-1}$  až  $\text{ng L}^{-1}$ . Stanovení jsou častokrát doprovázena vysokým pozadím slepých vzorků (blanků), neboť některé laboratorní vybavení a součásti přístrojů mohou obsahovat polytetrafluorethylen, z kterého se během analýz uvolňují právě stanovované perfluorované sloučeniny.

Metoda extrakce tuhou fází následovaná plynovou chromatografií-hmotnostní spektrometrií s negativní chemickou ionizací (SPE-GC-NCI-MS) byla použita pro stanovení ultrastopových koncentrací perfluorovaných karboxylových kyselin ve vzorcích odpadních vod. Cílem předkládané bakalářské práce bylo zjistit, zda jsou tyto sloučeniny přítomny i v odpadní vodě hlavního města Prahy, přičemž již dříve byl zjištěn jejich výskyt ve Vltavě řádově v  $\text{pg mL}^{-1}$ .

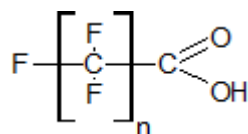
## 2. Teoretický úvod

Perfluorované karboxylové kyseliny (PFCAs) představují čistě antropogenní chemikálie [1]. V globálním environmentálním měřítku patří do skupiny významných kontaminantů [2]. Přetrvávají v životním prostředí, jsou rezistentní k hydrolyze, fotolýze, mikrobiálnímu rozkladu či k metabolismu obratlovců [1]. Akumulují se v potravinových řetězcích a vyznačují se dlouhým poločasem odbourání z lidského organismu [3].

Ačkoliv tyto sloučeniny byly pravděpodobně přítomny v životním prostředí a také v živých organismech po mnoho desetiletí, jejich biologické účinky byly odhaleny teprve nedávno [2]. V současné době US Interagency Testing Committee (ITC) eviduje 50 perfluorovaných sloučenin (PFCs) kvůli jejich potenciální perzistenci a dlouhodobému transportu v životním prostředí. Jedná se zejména o dvě hlavní skupiny sloučenin: perfluorované karboxylové kyseliny a perfluorosulfonáty [1].

### 2.1 Chemická struktura

Perfluorované karboxylové kyseliny jsou analogy mastných kyselin s lineárním řetězcem, ve kterém jsou všechny alifatické vodíky nahrazeny atomem fluoru [4]. Na Obr. 2.1 je zobrazen strukturní vzorec PFCAs. Zejména vysokoenergetická vazba mezi uhlíkem a fluorem ( $\sim 110 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) a také tři páry nevazebných elektronů udělují těmto vysoce fluorovaným sloučeninám extrémní chemickou a tepelnou stabilitu [1]. Jsou označovány za „supersurfaktanty“, tj. sloučeniny, které jsou jednak hydrofobní a zároveň hydrofilní [5]. Unikátní fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je vysoká povrchová aktivita, hustota, tepelná stabilita, amfifilita, odolnost vůči alkalickému či kyselému prostředí a slabé intermolekulární interakce, jsou zodpovědné za jejich značné průmyslové využití, ale i za dlouhodobý transport v životním prostředí a schopnost akumulovat se v živých organismech [2].



**Obr. 2.1** Strukturní vzorec PFCAs



## 2.2 Průmyslové využití

V roce 1947 byla poprvé zahájena průmyslová výroba perfluorovaných kyselin. Soli PFCAs byly vyráběny 4 syntetickými procesy: elektrochemickou fluorinací, fluorotelomerní jodidovou oxidací, fluorotelomerní alkénovou oxidací a fluorotelomerní jodidovou karboxylací [6]. Od té doby nachází tyto látky široké uplatnění v elektrotechnickém, polovodičovém i fotografickém průmyslu a také v domácnostech [7].

Tvoří součást lubrikantů, podlahových leštidel, vosků, antikoročních materiálů, hasících pěn [7,8]. Jako surfaktanty se využívají k impregnaci papíru, textilií, potravinových obalů, koberců a kůže [3,7-8]. Při natírání vnějších povrchů dochází k tomu, že se perfluorovaná část molekuly orientuje do prostoru, čímž chrání povrch před působením hydrofilních i hydrofobních látek [3,7]. V porovnání se surfaktanty na bázi uhlovodíků, fluorované surfaktanty jsou chemicky odolnější vůči degradaci kyselinami, bázemi a oxidačními činidly [1]. Také více oslabují povrchové napětí vody, proto jsou PFCAs považovány za účinnější smáčedla [1,8]. Zejména perfluorooktanová kyselina, ve formě své ammoniové soli, slouží jako emulgátor při výrobě fluoropolymerů, především polytetrafluorethylenu (PTFE) [9].

## 2.3 Zdroje a výskyt v životním prostředí

V přírodě neexistují žádné přirozené zdroje PFCAs s dlouhými řetězci [10]. Určité mikroorganismy nebo vyšší rostliny jsou schopny produkovat některé fluorované organické sloučeniny. Rostlina rodu *Dichapetalum* produkuje monofluorooctovou kyselinu a některé houby jsou schopny produkovat fluor obsahující antimikrobiální látky [1]. Ovšem přirozeně produkováné fluorované organické sloučeniny obsahují v porovnání se syntetickými perfluorovanými sloučeninami pouze jeden atom fluoru. Odhaduje se, že v rozmezí let 1951 až 2004 bylo do životního prostředí uvolněno 3200 až 7300 tun PFCAs ve formě emisí. Z toho za většinu PFCAs (~80%) uvolněných do životního prostředí zodpovídají průmyslové výroby fluoropolymerů a jejich následné uplatnění v domácnostech [6]. K dnešnímu dni nebyly prokázány žádné přirozené rozkladné procesy pro PFCAs [11].

Fyzikálně-chemické vlastnosti PFCAs, jako zanedbatelná tenze páry, vysoká rozpustnost ve vodě a mírná sorpce na tuhé látky, je předurčují k akumulaci

v povrchových vodách [6]. Díky nízkým hodnotám  $pK_A$  se PFCAs v přírodě vyskytují především ve formě aniontů (pro PFOA  $pK_A = 2,80$ ) [7]. Bylo potvrzeno, že povrchové vody, z toho především oceány, obsahují většinu PFOA. Odhaduje se, že 2 až 12 tun PFOA je ročně transportováno přes oceán k Arktidě [6]. To může být taky důvodem, proč byly PFCAs nalezeny v tak geograficky odlehlých regionech [6]. Zejména PFCAs s větším počtem atomů uhlíku byly detekovány v různých druzích organismů za polárním kruhem [12]. Souvisí to se schopností bioakumulace, která narůstá s prodlužující se délkou perfluoroalkylového řetězce kyseliny [13].

Dalším zdrojem kontaminace životního prostředí perfluorovanými kyselinami mohou být jejich více těkavé neutrální prekurzory, které jsou emitovány do ovzduší, kde následně degradují na PFCAs [10,14]. Poslední studie ukazují, že se jedná o fluorotelomerní alkoholy (FTOHs) a polyfluorované sulfonamidy [15]. Zatím bylo prokázáno, že se FTOHs metabolicky transformují na PFOA v potkanech a také vlivem mikrobiálního metabolismu, ale dosud nebyl popsán přesný mechanismus atmosférické degradace FTOHs [10].

## 2.4 Vliv na živé organismy a životní prostředí

Poprvé byly v lidské krvi detekovány fluorované organické látky v roce 1968 [16]. V roce 2001 byla jedna z těchto sloučenin detekována metodou HPLC-ESI-MS/MS jako perfluorooktanová kyselina [17]. Od té doby byly perfluorované karboxylové kyseliny (PFCAs) běžně detekovány po celém světě ve vodách [18], vodních živočiších a ptácích [19-21], jejich prekurzory pak i ve vzduchu [14]. Důsledky globálního výskytu PFCAs, a s tím spojená trvalá expozice lidí a živých organismů, ještě pořád nejsou zcela objasněny. Dříve byly sice PFCAs považovány za metabolicky inertní a tudíž i netoxické, bylo však zjištěno, že tyto sloučeniny jsou biologicky aktivní [4]. U různých PFCAs bylo prokázáno, že vyvolávají hojné zmnožení peroxizomů a ovlivňují mitochondriální, mikrosomální a cytosolové enzymy, dále také proteiny zasahující do metabolismu lipidů v játrech hlodavců [13,22-23]. Toxické účinky PFCAs se liší v závislosti na délce uhlíkového řetězce a některé studie poukazují na fakt, že vylučování PFCAs močí hraje podstatnou roli při eliminaci jejich toxicity [13].

Expozice potkanů perfluorodekanovou kyselinou (PFDA) vedla ke snížení hladiny thyroideálních hormonů [24] a inaktivaci kanálu pro 2-aminopurin [25]. Spolu

s perfluorooktanovou kyselinou (PFOA) inhibuje PFDA vnitrobuněčnou komunikaci, především tzv. „gap junctions“, nebo-li skulinová spojení [26]. Perfluorooktanová kyselina se podílí také na tvorbě tumorů v Leydigových buňkách [27]. Toxické účinky PFOA se u potkanů liší v závislosti na pohlaví. Předpokládá se, že zde hraje významnou roli testosteron. Tento jev nebyl pozorován u ostatních PFCAs [13].

Americká agentura ochrany životního prostředí (The US Environmental Protection Agency) se snaží shromáždit data pojednávající o možných zdrojích PFOA z důvodu nežádoucích efektů této sloučeniny na lidské potomstvo [28]. Poločas odbourání PFOA z lidské krve se pohybuje kolem 4 let [29]. Farmakokinetika PFCAs s delšími řetězci nebyla zatím v lidském těle prozkoumána, ovšem u laboratorních zvířat přítomnost delších perfluoroalkylových řetězců odpovídá delší době eliminace [13]. Obecně lze říct, že všechny PFCAs nepodléhají katabolizmu, 2. fázi konjugace a chabě se vylučují močí z lidského organismu [28].

## 2.5 Stanovení v odpadních vodách

Limitující faktor pro stanovení PFCAs v přírodních matricích je jejich charakter. Spolehlivé metody extrakce, separace a identifikace v komplexních matricích jsou proto nutností [30]. Náročnost stanovení spočívá v nízkých koncentracích PFCAs ve vzorcích, v rozmezí ng až pg L<sup>-1</sup> nebo ng až pg g<sup>-1</sup> a v jejich slabé absorpci ultrafialového záření. Množství analytických metod bylo vyvinuto pro stanovení PFCAs v biotických a abiotických matricích, většina z nich chromatografických [31-32]. Nejčastěji využívanou metodou pro kvalitativní i kvantitativní stanovení PFCAs je vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí, z důvodu nízké těkavosti PFCAs a také jejich dobré rozpustnosti v organických rozpouštědlech. Vysoká citlivost a specificita měření PFCAs v rozdílných matricích byla dosažena metodou LC-ESI-MS/MS [32].

Čističky odpadních vod jsou jedním z hlavních zdrojů kontaminace vodního prostředí perfluorovanými sloučeninami [33-36]. Původ těchto látek, zejména PFOA a PFOS, v odtokových vodách čističek není zcela jasný. Předpokládá se, že zdrojem kontaminace mohou být průmyslové výroby fluoropolymerů, kde je PFOA přímo používána. Dále pak i komerčně dostupné čisticí prostředky, plasty, kosmetické přípravky nebo prostředky na ošetřování povrchů (např. oblečení nebo koberců)

obsahující perfluorované surfaktanty. Následující odstavce pojednávají o výskytu PFCAs v odpadních vodách v Evropě, Severní Americe a Asii.

### 2.5.1 Evropa

Na první screeningový projekt pojednávající o distribuci perfluorovaných alkylových sloučenin (PFASs) v životním prostředí severní Evropy bylo shromážděno celkem 120 vzorků sedimentu, odpadního kalu, vody a biologických vzorků od zúčastněných zemí (Norsko, Švédsko, Finsko, Dánsko a Island) [37]. Vodné vzorky byly stanoveny metodou SPE-HPLC-TOF. Perfluorooktanová kyselina (PFOA) byla nejčastěji se vyskytující perfluorovanou sloučeninou, následována perfluorohexanovou kyselinou (PFHxA). Průměrná koncentrace PFOA v mořské vodě byla  $5,2 \text{ ng L}^{-1}$ , v jezerní vodě  $7,8 \text{ ng L}^{-1}$  a v dešťové vodě  $13,1 \text{ ng L}^{-1}$ . Na rozdíl od toho bylo v odpadní vodě stanoveno  $20,5 \text{ ng L}^{-1}$  PFOA a ve vodě ze skládek až  $297 \text{ ng L}^{-1}$ .

Vzorky odpadní vody byly odebrány z devíti čističek odpadních vod podél řeky Labe mezi Lauenburgenem a Cuxhavenem, Německo [38]. Ve všech odebraných vzorcích byly nalezeny  $\text{C}_5\text{-C}_{10}$  PFCAs. Převládající složkou byla PFOA, stanovená v koncentračním rozsahu od  $12,3$  do  $77,6 \text{ ng L}^{-1}$ . Perfluoroundekanová (PFUnA) a perfluorododekanová kyselina (PFDoA) byly detekovány sporadicky.

V Dánsku byly ze šesti městských čističek odebrány vzorky přítokové i odtokové vody [39]. Ze čtyř průmyslových čističek byly odebrány pouze vzorky odtokové vody. Jako vnitřní standard byla použita  $^{13}\text{C}_2$ -PFDA. Extrakce tuhou fází následovaná LC-ESI-MS/MS byla použita na stanovení všech vzorků. Jako dominantní složky byly opět ve všech vzorcích přítokové i odtokové vody stanoveny PFOA a PFOS. Obecně koncentrace PFOA a PFOS stanovené v odtokové vodě byly vyšší v porovnání s koncentracemi nalezenými v přítokové vodě.

### 2.5.2 Severní Amerika

Deset městských čističek bylo v USA testováno na přítomnost perfluorovaných sloučenin v přítokových i odtokových odpadních vodách [35]. Vzorky byly nejprve centrifugovány a následně analyzovány metodou HPLC-ESI-MS/MS. Ze stanovovaných PFCAs byly PFHxA, PFHpA a PFOA detekovány ve všech deseti čističkách, zatímco PFNA v pěti a PFDA pouze ve třech čističkách. Koncentrace

PFCAs nalezených v přítokové a odtokové vodě se měnily v závislosti na dané čističce. Nebylo možné vyvodit obecný závěr, zda čističky odpadních vod eliminují přítomnost PFCAs ve vodním prostředí, nebo naopak jsou zdrojem jejich kontaminace.

Vzorky přítokové a odtokové vody byly odebrány z čističky odpadních vod v Iowa City [33]. V odtokové vodě byly stanoveny koncentrace PFOA ( $22 \pm 2,1 \text{ ng L}^{-1}$ ) a PFOS ( $26 \pm 2,0 \text{ ng L}^{-1}$ ). Přítomnost těchto dvou sloučenin byla pozorována i v přítokové vodě, ovšem nebylo možné provést kvantitativní stanovení z důvodu nízkých výtěžností obdržených z naspikovaných vzorků.

Metodou HPLC-ESI-MS/MS byly analyzovány vzorky ze šesti čističek odpadních vod v New Yorku [34]. Jako vnitřní standard byla použita značená  $^{13}\text{C}$ -PFOA. Dominantní složkou přítomnou ve vzorcích ze všech čističek odpadních vod byla opět PFOA. Nejvyšší koncentrace PFOA byly zjištěny ve dvou městských čističkách, které upravují pouze vodu z kanceláří, nákupních center, nemocnic a domácností, nikoliv z průmyslových výrobníků. To naznačuje, že PFCAs a zejména PFOA se mohou vyskytovat řádově v stovkách  $\text{ng L}^{-1}$  v odpadních vodách i bez vlivu průmyslové výroby fluoropolymerů. Naopak PFHxA a PFDoA nebyly detekovány ani v jediném vzorku.

Přítomnost perfluorosulfonátů a PFCAs byla stanovována ve vzorcích odpadní vody odebraných z dvou čističek odpadních vod v různých časových obdobích [40]. Jednalo se o venkovní čističku v Kentucky a městskou čističku v Georgii. V Kentucky byly hlavními stanovenými složkami PFOA ( $22\text{-}334 \text{ ng L}^{-1}$ ) a PFOS ( $7\text{-}149 \text{ ng L}^{-1}$ ). Také v čističce v Georgii byla PFOA ( $1\text{-}227 \text{ ng L}^{-1}$ ) stanovena jako prioritně se vyskytující sloučenina. Perfluorononanová kyselina spolu s PFDA byly stanoveny ve většině vzorků, zatímco PFUnA a PFDoA minimálně. Detekovaná množství PFOA v odtokové vodě byla obecně vyšší než ve vzorcích přítokové vody. Podstatné koncentrační rozdíly PFCs ve vzorcích odebíraných v různých časových obdobích nebyly pozorovány. Porovnáním obou čističek bylo zjištěno, že venkovní čistička v Kentucky obsahovala celkově vyšší koncentrace stanovovaných perfluorovaných sloučenin.

### 2.5.3 Asie

Metoda extrakce tuhou fází, využívající jako sorbentu nanočástice  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  pokryté cetyltrimethylammonium bromidem, následovaná HPLC-ESI-MS/MS byla použita pro stanovení sedmi perfluorovaných sloučenin ve vodných vzorcích odebraných z různých okresů Peking, Čína [41]. Jednalo se o vzorky dešťové, pitné, říční a přítokové odpadní vody (čistička odpadních vod Gaobeidian, okres Chaoyang, Peking). V odpadní vodě byly z PFCAs stanoveny: PFOA ( $11,42 \text{ ng L}^{-1}$ ), PFNA ( $2,30 \text{ ng L}^{-1}$ ), PFDA ( $2,43 \text{ ng L}^{-1}$ ), PFUnA ( $0,63 \text{ ng L}^{-1}$ ) a PFDoA ( $0,37 \text{ ng L}^{-1}$ ). Účinnost prekoncentračního kroku se pro PFCAs stanovené v odpadní vodě pohybovala od 72 do 97 %. Koncentrace PFOA a PFOS stanovené v odpadní a říční vodě byly podstatně vyšší v porovnání s koncentracemi stavenými v ostatních vzorcích.

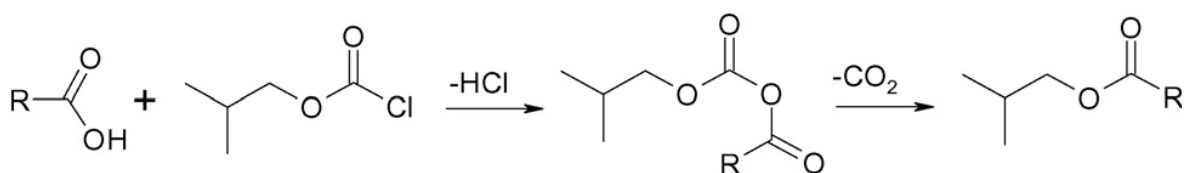
Přítomnost 10 perfluorovaných sloučenin, z toho  $\text{C}_6\text{-C}_{12}$  PFCAs, byla sledována metodou SPE-HPLC-MS/MS v přítokové i odtokové vodě ze dvou městských taiwanských čističek a také v odtokové vodě z jedné průmyslové čističky [42]. Nejvyšší koncentrace ve vzorcích přítokové i odtokové vody byly dosaženy u PFOS ( $293 \text{ ng L}^{-1}$ ) a PFHxA ( $406 \text{ ng L}^{-1}$ ). Vysoké koncentrace PFCs (až  $10\,000 \text{ ng L}^{-1}$ ) byly stanoveny v odtokové vodě z industriální čističky, přičemž převládaly perfluorované alkylové sloučeniny nad PFCAs.

## 2.6 Stanovení pomocí GC-NCI-MS

V předkládané bakalářské práci byla pro stanovení perfluorovaných karboxylových kyselin použita metoda plynové chromatografie následovaná hmotnostní spektrometrií s negativní chemickou ionizací. Negativní chemická ionizace byla zvolena z důvodu vysoké elektronegativity atomu fluoru a s tím spojené schopnosti tvořit stabilní anionické fragmenty. Před samotným stanovením bylo ovšem nutné vzorky derivatizovat. Teoreticky by PFCAs měly být přímo stanovitelné GC technikami, protože jsou dostatečně těkavé [43]. Ovšem jejich chromatografické píky jsou často značně rozmývány jako důsledek vysoké polarit. Jedná se o tzv. „tailing“, nebo-li chvostování. Perfluorované kyseliny jsou derivatizací převedeny na těkavější a zároveň méně polární deriváty, estery.

## 2.7 Proces derivatizace

V předkládané bakalářské práci bylo využito procesu esterifikace, kde PFCAs reagují s isobutylchloroformátem [43]. Nejprve se isobutyl naváže na perfluorovanou karboxylovou kyselinu za vzniku labilního anhydridu dané kyseliny a současného uvolnění kyseliny chlorovodíkové. Anhydrid se okamžitě dekarboxyluje na ester dané kyseliny, přičemž se uvolňuje oxid uhličitý. Jako katalyzátor zde vystupuje pyridin, isobutylalkohol slouží jako pomocná látka. Na Obr. 2.2 je zobrazené schéma procesu derivatizace. Kromě zmíněných isobutylesterů vznikají v průběhu reakce také minoritní těkavé složky, které by neměly interferovat v průběhu stanovení. Velkou výhodou je možnost spojení tohoto derivatizačního kroku s účinnou SPE prekoncentrací, což umožňuje stanovení PFCAs v abiotických matricích.



**Obr. 2.2** Mechanismus procesu derivatizace [43]

## 2.8 Kontaminace slepých vzorků

Jednou z hlavních komplikací spojených se stopovou analýzou perfluorovaných karboxylových kyselin, zejména PFOA, je kontaminace pozadí u slepých vzorků (blanků) [44]. Z důvodu jejich kontaminace, jsou limity detekce (LOD) u perfluorovaných organických kyselin ve vzorcích vod vysoké, v rozmezí několika desítek až stovek  $\text{ng L}^{-1}$  do jednotek  $\mu\text{g L}^{-1}$  [18].

Zdroje kontaminace perfluorovaných sloučenin v laboratoriích nejsou zcela dobře charakterizovány [2,18,44]. Většinou se jedná o dva rozdílné zdroje, instrumentální a procesní. Jedním ze známých zdrojů procesní kontaminace jsou fluoropolymery, jako je polytetrafluorethylen (PTFE) nebo perfluoroalkoxylové sloučeniny. Tyto materiály, které jsou součástí různého laboratorního vybavení a přístrojů, nesmí během stanovení PFCAs v biotických nebo abiotických matricích přijít do kontaktu se vzorkem.

### 3. Experimentální část

#### 3.1 Reagencie a standardy

Jako analytické standardy byly použity tyto látky: perfluorohexanová kyselina (PFHxA, >97 %, Fluka, Německo), perfluoroheptanová kyselina (PFHpA, 95 %), perfluorooktanová kyselina (PFOA, 96 %), perfluorononanová kyselina (PFNA, 97 %), perfluorodekanová kyselina (PFDA, 98 %), perfluoroundekanová kyselina (PFUnA, 95 %) a perfluorododekanová kyselina (PFDoA, 95 %) všechny dodané od Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo.

Ostatní použité chemikálie: acetonitril ( $\geq 99,5$  %, Fluka, Německo), n-hexan ( $>95$  %, Fluka, Německo), methanol ( $\geq 99,9$  %, Merck, Německo), tetrabutylammonium bromid (98 %, Fluka, Německo), isobutylchloroformát (98%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), pyridin (99+ %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), isobutylalkohol (čistota p.a., PENTA, Chrudim, Česká republika), aceton (čistota p.a., Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika) a deionizovaná voda (Milli-Q plus systém, Millipore, USA).

Zásobní roztoky sedmi perfluorovaných karboxylových kyselin (PFCAs) o koncentraci  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  byly připraveny do 10 mL odměrných baněk navážením standardů jednotlivých kyselin a doplněním po rysku acetonitrem. Poté byly roztoky kvantitativně převedeny do 15 mL polypropylénových šroubovacích centrifugačních zkumavek, ve kterých byly v lednici po dobu měření uschovávány.

#### 3.2 Přístroje a zařízení

Pro GC-NCI-MS měření PFCAs byl použit chromatograf GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Kjóto, Japonsko) vybavený kolonou RTX-200MS (Restek, USA) s rozměry  $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm i.d.}$  a tloušťkou filmu stacionární fáze  $0,25 \text{ }\mu\text{m}$ . Jako nosný plyn bylo použito helium (99,999%, Linde) s konstantním lineárním průtokem  $36,1 \text{ cm s}^{-1}$ . Dávkovací doba vzorku byla 1 minuta. Dávkovaný objem vzorku byl  $1 \text{ }\mu\text{L}$  ve Splitless dávkovacím modu. Teplota nástřiku vzorku byla  $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Zvolený teplotní program: Počáteční teplota kolony byla po dobu 3 minut udržována na  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , poté zvyšována po  $10 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  až na  $150 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po dosažení  $150 \text{ }^{\circ}\text{C}$  byla teplota



kolony opět zvyšována po  $30\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  na konečnou teplotu  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Konečná teplota  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$  byla udržována po dobu 2 minut. Celkový čas analýzy byl 17.67 minut.

Od nástřiku po dobu 4 minut hmotnostní spektrometr nedetekoval, aby se předešlo vysokému píku rozpouštědla (hexan) v chromatografickém záznamu. Teplota přívodu vzorku do hmotnostního spektrometru (transfer line) byla udržována na  $210\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Hmotnostní spektrometr byl nastaven v SIM modu na specifické  $m/z$  hodnoty pro každou perfluorovanou karboxylovou kyselinu, které jsou uvedeny v Tab. 3.1.

**Tab. 3.1** Monitorované hodnoty  $m/z$  pro stanovení jednotlivých PFCAs

Látka	Monitorované časové okno	Monitorované hodnoty
	min	$m/z$
PFHxA	7,00 – 8,00	<b>278</b> , 350, 250, 307, 297, 294
PFHpA	8,00 – 9,00	<b>328</b> , 300, 400, 357, 262, 344
PFOA	9,00 – 10,00	<b>378</b> , 350, 312, 450, 407, 209
PFNA	10,00 – 11,00	<b>428</b> , 400, 281, 362, 209, 500
PFDA	11,00 – 12,00	<b>478</b> , 450, 412, 281, 209
PFUnA	12,00 – 12,75	<b>528</b> , 462, 500, 331, 209
PFDaA	12,75 - 17,60	<b>578</b> , 512, 550, 209, 331

Dominantní hodnota  $m/z$  pro každou PFCA je zvýrazněna.

### 3.3 Pracovní postup

Pro stanovení PFCAs v odpadních vodách byla použita voda z Ústřední čističky odpadních vod (ÚČOV), Praha, Česká republika. Jednalo se o přítokovou vodu (odebraná 17. června 2010) a odtokovou vodu (odebraná 9. července 2009). Samotný odběr vody nebyl náplní předkládané bakalářské práce. Oba vzorky byly skladovány v lednici v polyethylenových lahvích, do té doby, než byly změřeny.

#### 3.3.1 Filtrace

U vzorku přítokové vody nebyla filtrace nutná, během prekoncentračního kroku nedošlo k ucpání SPE kolonky. Ovšem při samotné SPE prekoncentraci vzorku odtokové vody došlo k ucpání kolonky, proto bylo nutné odtokovou vodu přefiltrovat. Na filtraci byly použity tři typy filtrů v následujícím pořadí: filtr č. 388, filtr č. 389 a

filtr č. 390. Filtrace nebyla dostatečně účinná, došlo k opětovnému ucpání kolonky. Přefiltrovaný vzorek odtokové vody byl proto následně centrifugován na centrifuze typu MPW-360 rychlostí 4000 rpm (otáček za minutu) po dobu 30 minut. Nakonec byl vzorek vakuově přefiltrován (filtrační aparatura Supelco, Inc.) přes membránový filtr Nylon s porózitou 0,45  $\mu\text{m}$  a průměrem 47 mm (Whatman, Maidstone, UK).

### 3.3.2 SPE prekoncentrace

Pro kondicionaci SPE kolonky (Supel<sup>TM</sup>-Select HLB 54183-U SPE tubes, 200 mg, 6 mL, Sigma-Aldrich, Německo) byl použit methanol a deionizovaná voda. Methanol o objemu 6 mL byl pipetován do kolonky. Po samovolném překapání bylo následně odpipetováno 10 mL deionizované vody, která se rovněž nechala volně překapat. Tímto postupem bylo zabráněno zbytečnému vysychání kolonky.

Na jedno stanovení PFCAs bylo použito 250 mL odpadní vody. Vzorek odpadní vody byl vyndán z lednice a temperován na laboratorní teplotu. Do vzorku odpadní vody bylo odpipetováno 100  $\mu\text{L}$  tetrabutylammonium bromidu (TBABr) o koncentraci 125 g L<sup>-1</sup>, který zastával funkci iontové párového činidla. Celková koncentrace TBABr ve 250 mL vzorku byla 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Plastová láhev se vzorkem odpadní vody byla umístěna na stojan přibližně 50 cm nad pracovní desku digestoře. Plastovou hadičkou byl podtlakem 0,4 kPa čerpán vzorek rychlostí 1-2 kapky za sekundu přes SPE kolonku. Po přečerpání vzorku byl otevřen regulační kohout. Kolonka byla ponechána 30 minut prosychat proudem vzduchu.

Vzorek byl z kolonky eluován 4 mL methanolu do čisté 15 mL polypropylénové šroubovací centrifugační zkumavky. Zbytky zadržovaného eluátu na kolonce byly několikrát pomocí plastové injekční stříkačky manuálně vytlačeny z kolonky. Poté byl eluát odpařen při 64 °C pod proudem vzduchu do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 625  $\mu\text{L}$  acetonitrilu a protřepán na třepačce po dobu 1 minuty. Postup uvedené SPE prekoncentrace odpovídal prekoncentračnímu faktoru  $f = 400$ . Stejný postup byl aplikován i pro blank.

### 3.3.3 Derivatizace

Po SPE prekoncentraci bylo nutné vzorek okamžitě derivatizovat, neboť časem docházelo k degradaci a úbytku PFCAs ve vzorku. Pro derivatizaci bylo pipetováno třikrát 178  $\mu\text{L}$  z 625  $\mu\text{L}$  získaných po SPE prekoncentraci odpadní vody do třech polypropylénových mikroeppendorfek. Tímto způsobem byly po každé SPE prekoncentraci získány celkem tři vzorky na analýzu.

Ke každému vzorku byla v následujícím pořadí pipetována tato derivatizační činidla: 8  $\mu\text{L}$  isobutylalkoholu, 4  $\mu\text{L}$  pyridinu a 10  $\mu\text{L}$  isobutylchloroformátu. Reakční směs se nechala 20 sekund reagovat v ultrazvukové lázni. Poté se nechala 8 minut ustálit. Po osmi minutách bylo do reakční směsi odpipetováno 200  $\mu\text{L}$  hexanu. Následně byla směs 1 minutu protřepána na třepačce Vortex. Rychlost třepání byla 4-5. Po třepání byla odebrána horní hexanová fáze do polypropylénové krimpovací špičaté vialky. Vzorky se nechaly 30 minut ustálit a poté byly změřeny GC-NCI-MS.

Tyto vialky byly použity z důvodu zabránění odtékání hexanu. V ostatních vialkách hexan rychleji vytéká, co vede ke zkreslování výsledků. Předpokládá se, že 100 % perfluorovaných kyselin převedených na jejich isobutylestery přechází do hexanu.

### 3.3.4 Kalibrační závislosti

Pro GC-NCI-MS stanovení isobutylesterů perfluorovaných karboxylových kyselin ve vzorcích odpadní vody byly sestaveny kalibrační závislosti pro jednotlivé kyseliny v rozmezí od 0,05 do 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Pro sestavení kalibrační závislosti každé perfluorované kyseliny byl použit zásobní roztok dané kyseliny o koncentraci 1  $\text{mg mL}^{-1}$ . Předem zvolené koncentrace: 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  byly pro každou kyselinu připraveny ředěním zásobního roztoku příslušné kyseliny. Spočtený objem jednotlivých kyselin byl pipetován ze zásobních roztoků příslušných kyselin do 15 mL polypropylénových šroubovacích centrifugačních zkumavek a doplněn acetonitrem na celkový objem 5 mL. Následně bylo z připravených roztoků o daných koncentracích pipetováno třikrát 178  $\mu\text{L}$  určených k derivatizaci. Tímto postupem bylo měření příslušné koncentrace PFCAs vždy prováděno třikrát. Z naměřených ploch píků odpovídajícím příslušným koncentracím dané kyseliny byl určen medián, který byl následně použit pro sestavení kalibračních závislostí jednotlivých kyselin.

## 4. Výsledky a diskuze

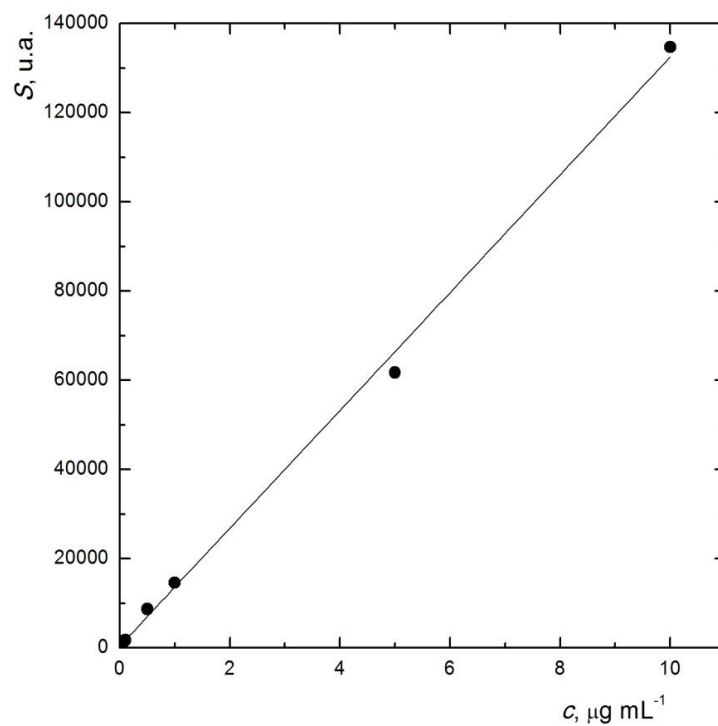
K vyhodnocování chromatografických záznamů bylo využito programu GCMS Solution Version 2.70 (Shimadzu Corporation, Japonsko). K provádění potřebných výpočtů a tvorbě grafů uvedených v této bakalářské práci bylo použito programů Origin Pro 8.0 (OriginLab Corporation, USA) a Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA).

### 4.1 Vyhodnocení kalibračních závislostí

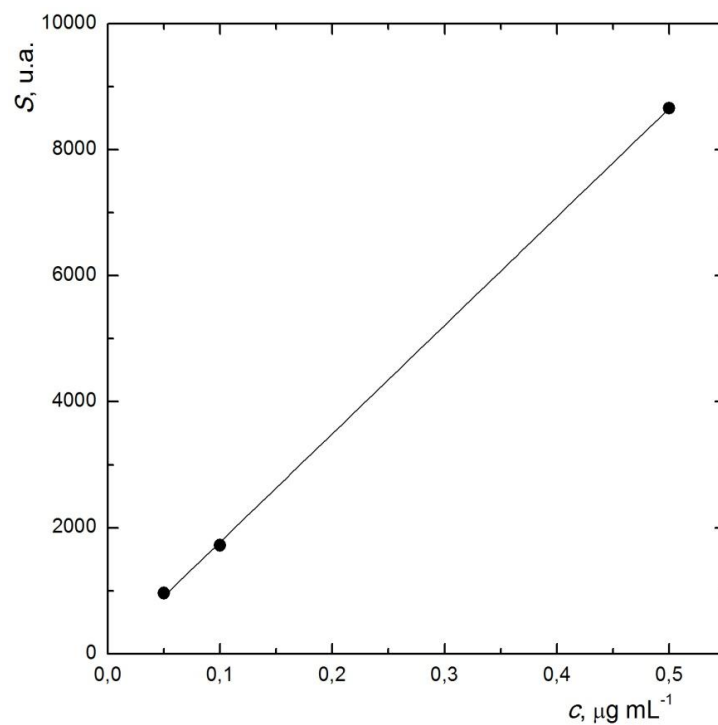
Pro jednotlivé perfluorované karboxylové kyseliny (PFCAs) byly sestaveny grafy kalibračních závislostí v rozmezí 0,05 až 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Na Obr. 4.1 je zobrazena vzorová kalibrační závislost pro perfluorooktanovou kyselinu (PFOA) se čtvercem korelačního koeficientu  $R^2 = 0,9972$ . Hodnoty  $R^2$  zbylých perfluorovaných kyselin byly v rozmezí 0,9952 až 0,9985.

V důsledku řádově širokého rozpětí koncentrací nebyla v celém rozsahu kalibračních závislostí dosažena dostatečná linearita. Z toho důvodu byly kalibrační přímky všech PFCAs rozděleny na dva úseky. První tři body kalibračních závislostí (0,05; 0,1 a 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) představovaly první úsek, zbylé body kalibračních závislostí (1; 5 a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) tvořily úsek druhý. Rozdělením kalibračních závislostí na 2 úseky došlo ke zvýšení hodnot čtverců korelačních koeficientů. Pro první úseky kalibračních závislostí všech PFCAs se hodnoty  $R^2$  pohybovaly v rozmezí 0,9975 až 1. Na Obr. 4.2 je zobrazena kalibrační závislost PFOA v rozmezí 0,05 až 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  se čtvercem korelačního koeficientu rovným 1.

První úsek kalibračních závislostí v rozmezí 0,05 až 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  byl použit ke stanovení účinnosti SPE prekoncentrace pro jednotlivé perfluorované kyseliny a k vypočítání koncentrací PFCAs nalezených ve vzorcích odpadní vody, neboť naměřené plochy píků nalezených kyselin spadaly do této koncentrační oblasti.

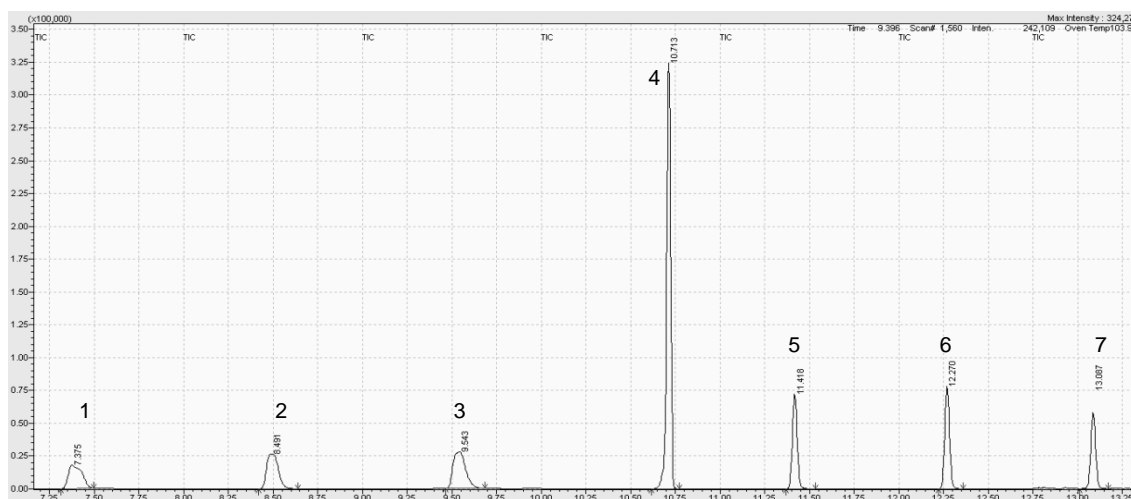


**Obr. 4.1** Kalibrační závislost PFOA v koncentračním rozsahu 0,05 až 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ;  
analytická metoda GC-NCI-MS (SIM)



**Obr. 4.2** Kalibrační závislosti PFOA v koncentračním rozsahu 0,05 až 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  
analytická metoda GC-NCI-MS (SIM)

Na Obr. 4.3 je uveden vzorový chromatogram standardů příslušných perfluorovaných karboxylových kyselin. Jedná se o časový úsek od 7,25 do 13,25 min, ve kterém eluují všechny sledované perfluorované kyseliny. Jednotlivé kyseliny eluují podle vzrůstající délky svého perfluorovaného řetězce, první tedy eluuje perfluorohexanová kyselina (PFHxA) a poslední perfluorododekanová kyselina (PFDoA).



**Obr. 4.3** Chromatografický záznam separace směsi sedmi standardů perfluorovaných kyselin o koncentraci  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Zobrazené píky: PFHxA (1), PFHpA (2), PFOA (3), PFNA (4), PFDA (5), PFUnA (6) a PFDoA (7). Experimentální podmínky jsou uvedeny v kap. 3.2.

V Tab. 4.1 jsou uvedeny relativní směrodatné odchylky (RSD) retenčních časů  $t_R$  příslušných perfluorovaných kyselin v celém rozsahu kalibračních závislostí ( $0,05$  až  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Nejvyšší RSD ( $0,26 \%$ ) byla dosažena u perfluorononanové kyseliny (PFNA). S využitím GC-EI-MS měření, za stejných pracovních podmínek jako při GC-NCI-MS stanovení, bylo zjištěno, že v čase samotné eluce PFNA eluuje i široký pík diisobutylesteru kyseliny uhličitě. Jedná se o minoritní těkavou složku vzniklou během derivatizačního kroku. Daný diisobutylester zřejmě rušil ionizaci v momentě eluce esteru PFNA, což se promítlo do variability polohy maxima jeho píku a dále pak i do nejširšího rozpětí retenčních časů v porovnání s ostatními perfluorovanými kyselinami.

**Tab. 4.1** Relativní směrodatné odchylky (%) retenčních časů  $t_R$  jednotlivých PFCAs v celém rozsahu kalibračních závislostí pro  $n = 18$

Kyselina	$t_R$ min	RSD %
PFHxA	7,385	0,071
PFHpA	8,498	0,091
PFOA	9,544	0,062
PFNA	10,724	0,256
PFDA	11,421	0,032
PFUnA	12,271	0,016
PFDoA	13,087	0,013

## 4.2 Účinnost SPE prekoncentrace

Do 250 mL vzorku přítokové i odtokové vody bylo spikováno 35  $\mu\text{L}$  směsi 7 kyselin o koncentraci 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Výsledná koncentrace každé kyseliny v 250 mL vzorku přítokové i odtokové vody byla 0,14  $\text{ng mL}^{-1}$ . Po SPE prekoncentraci a následné derivatizaci byla výsledná koncentrace každé kyseliny ve směsi v hexanu 0,05  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Plochy píků nalezených perfluorovaných kyselin ve vzorcích odpadní vody byly odečteny od ploch píků PFCAs z naspikovaných vzorků odpadní vody. Výsledné hodnoty ploch byly dosazeny do rovnic kalibračních závislostí jednotlivých kyselin, z kterých byly vypočteny koncentrace příslušných PFCAs. Poměr naměřené koncentrace dané kyseliny k teoreticky vypočtené byl vynásoben stem, čímž byla zjištěna účinnost prekoncentračního kroku v procentech. V případě, že daná kyselina nebyla nalezena ve vzorku přítokové respektive odtokové vody, byla pro zjištění výtěžnosti SPE prekoncentrace použita přímo plocha z naspikovaného vzorku odpadní vody, která byla dosazena do rovnice kalibrační závislosti příslušné kyseliny. A opět na základě poměru naměřené a teoreticky vypočtené koncentrace dané kyseliny byla stanovena prekoncentrační účinnost. V Tab. 4.2 jsou uvedeny dosažené účinnosti prekoncentračního kroku pro jednotlivé perfluorované kyseliny v naspikovaných vzorcích odpadní vody.

**Tab. 4.2** Účinnost SPE prekoncentrace jednotlivých kyselin ve vzorcích odpadní vody s přidanou koncentrací  $0,14 \text{ ng mL}^{-1}$  s odpovídajícími RSD pro  $n = 6$

Kyselina	Účinnost prekoncentrace	RSD
	%	%
PFHxA	102	4
PFHpA	93	2
PFOA	99	12
PFNA	86	8
PFDA	60	4
PFUnA	56	7
PFDoA	51	14

Pro testování odlehlosti výsledků byl použit Grubbsův test. V případě, že byla určitá hodnota účinnosti SPE prekoncentrace v % stanovena jako odlehlá, byla ze souboru hodnot vyloučena a medián byl určen ze zbylých hodnot souboru. Z tabulky 4.2 je patrné, že účinnost prekoncentračního kroku obecně klesá s prodlužující se délkou perfluorovaného řetězce dané kyseliny.

### 4.3 Stanovení LOD a LOQ

Pro stanovení limitů detekce (LOD) a limitů kvantifikace (LOQ) jednotlivých perfluorovaných kyselin byly využity poměry signálu a šumu (S/N) odpovídající plochám píků s nejnižší dosaženou koncentrací příslušných kyselin ( $0,05 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) v kalibračních závislostech. Relativní směrodatné odchylky hodnot S/N poměrů byly pro všechny perfluorované kyseliny v rozmezí 0,5 až 3 %. Tyto poměry byly následně přepočteny na koncentrace kyselin odpovídajících hodnotám  $S/N = 3$  pro LOD a  $S/N = 10$  pro LOQ. Limity detekce a kvantifikace jednotlivých kyselin pro celou metodu (SPE-GC-NCI-MS) byly získány zahrnutím prekoncentračního faktoru  $f = 400$  a účinnosti SPE prekoncentrace jednotlivých kyselin. V Tab. 4.3 jsou uvedeny limity detekce a limity kvantifikace jednotlivých perfluorovaných kyselin pro celou metodu.



**Tab. 4.3** Hodnoty LOD a LOQ jednotlivých kyselin pro SPE-GC-NCI-MS

Kyselina	LOD	LOQ
	pg mL <sup>-1</sup>	pg mL <sup>-1</sup>
PFHxA	21	71
PFHpA	12	41
PFOA	7	24
PFNA	1	4
PFDA	6	20
PFUnA	6	19
PFDaA	10	32

Nejnižší limit detekce (1 pg mL<sup>-1</sup>) a kvantifikace (4 pg mL<sup>-1</sup>) byl dosažen u perfluorononanové kyseliny (PFNA). Jak lze vidět na Obr. 4.3, PFNA poskytuje nejvyšší signál a tudíž i odezvosý faktor (velikost signálu odpovídající jednomu molu dané látky). Lze tedy tvrdit, že právě pro tuto kyselinu je citlivost měření nejvyšší. Naopak nejvyšší limit detekce (21 pg mL<sup>-1</sup>) a kvantifikace (71 pg mL<sup>-1</sup>) byl stanoven u perfluorohexanové kyseliny (PFHxA), jak vyplývá z tabulky 4.3.

Obecně lze říci, že použitá metoda je citlivější pro stanovení PFCAs s delším perfluorovaným řetězcem, kde je počet atomů C vyšší než 8, neboť limity detekce a kvantifikace jsou, v porovnání s kyselinami s kratší délkou řetězce (počet atomů C je menší než 8) nižší. S tím ovšem nesouhlasí hodnota LOD a LOQ dosažena u perfluorododekanové kyseliny (PFDaA). Porovnáním hodnot poměrů S/N získaných pro PFDA, PFUnA a PFDaA lze konstatovat, že S/N odpovídající PFDaA je přibližně o 30 jednotek menší než u PFDA nebo PFUnA. Důvodem mohl být vyšší šum základní linie, neboť PFDaA byla poslední stanovovanou kyselinou eluující z kolony. Za ní eluovaly látky zadržované na koloně, popřípadě i nečistoty z předešlých analýz. Teplotní program byl proto poslední dvě minuty nastaven na 200°C, aby došlo k vyčištění kolony.

#### 4.4 Vyhodnocení reálných vzorků

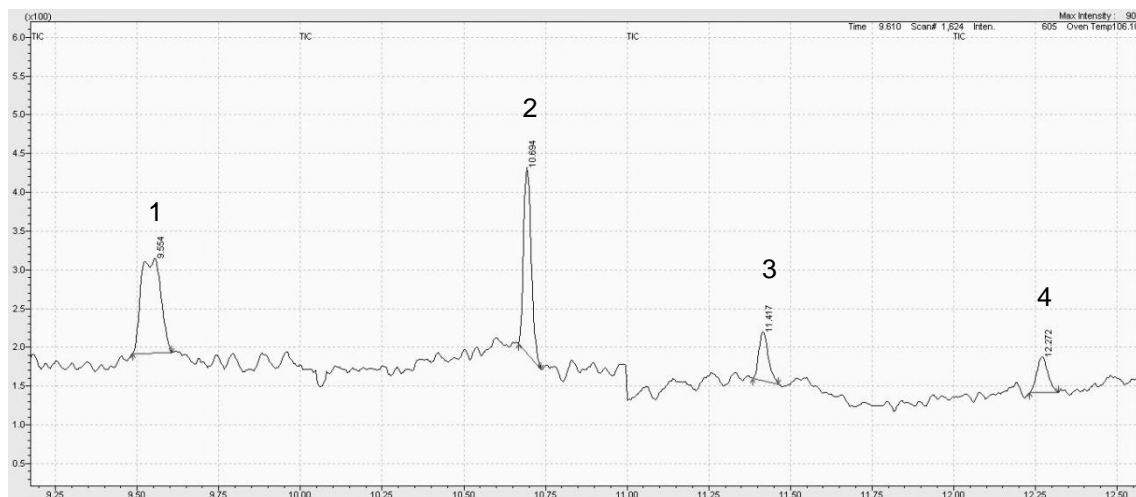
Pomocí SPE-GC-NCI-MS byl zanalyzován vzorek přítokové a odtokové odpadní vody. Dosazením naměřených ploch píků odpovídajících nalezeným perfluorovaným kyselinám v přítokové a odtokové vodě do rovnic kalibračních závislostí jednotlivých kyselin byly dopočteny příslušné koncentrace kyselin. Pro zjištění skutečné koncentrace daných kyselin v 250 mL přítokové i odtokové vodě bylo nutné zahrnout také prekoncentrační faktor  $f = 400$  a účinnost SPE prekoncentrace jednotlivých kyselin. V Tab. 4.4 jsou uvedeny koncentrace stanovených perfluorovaných kyselin v přítokové i odtokové vodě.

**Tab. 4.4** Výsledné koncentrace PFCAs stanovených v přítokové a odtokové vodě s odpovídajícími RSD pro  $n = 3$  v závorkách

Kyselina	Přítoková voda $\text{pg mL}^{-1}$	Odtoková voda $\text{pg mL}^{-1}$
PFHxA	< LOD	< LOD
PFHpA	< LOD	< LOD
PFOA	78 (8)	39 (12)
PFNA	63 (1)	89 (6)
PFDA	< LOQ	58 (7)
PFUnA	< LOQ	95 (4)
PFDoA	< LOD	101 (13)

Porovnáním výsledků obdržených analýzou přítokové a odtokové vody lze tvrdit, že perfluorohexanová kyselina (PFHxA) spolu s perfluoroheptanovou (PFHpA) nebyly ani v jednom vzorku odpadní vody detekovány. Perfluorononanová kyselina (PFNA) byla stanovena v obou vzorcích, v přítokové vodě  $63 \text{ pg mL}^{-1}$  a v odtokové vodě  $89 \text{ pg mL}^{-1}$ . Perfluorooktanová kyselina (PFOA) byla také kvantifikována v přítokové ( $78 \text{ pg mL}^{-1}$ ) i odtokové vodě ( $39 \text{ pg mL}^{-1}$ ). Na rozdíl od toho, PFDA a PFUnA byly stanoveny v odtokové vodě, přičemž v přítokové vodě byly pod limitem kvantifikace. Vůbec nejvyšší naměřená koncentrace ( $101 \text{ pg mL}^{-1}$ ) byla dosažena u PFDoA v odtokové vodě, zatímco v přítokové vodě byla tato kyselina pod limitem detekce.

Na Obr. 4.4 je uvedena část chromatografického záznamu analýzy vzorku přítokové vody. Jedná se o časový úsek v rozmezí 9,25 až 12,50 minut z celkové doby analýzy 17,67 minut. V tomto časovém okně eluují v následujícím pořadí: perfluorooktanová kyselina (PFOA), perfluorononanová kyselina (PFNA), perfluorodekanová kyselina (PFDA) a perfluoroundekanová kyselina (PFUnA).



**Obr. 4.4** Část chromatografického záznamu přítokové vody. Zobrazené píky:  
PFOA (1), PFNA (2), PFDA (3), PFUnA (4).

## 5. Závěr

Předmětem této bakalářské práce bylo stanovení perfluorovaných karboxylových kyselin (PFCAs) v odpadní vodě metodou SPE-GC-NCI-MS s derivatizačním krokem. Perfluorované kyseliny byly již dříve stanoveny ve Vltavě stejnou metodou v koncentracích řádově  $\text{pg mL}^{-1}$  [5], proto se předpokládalo, že se mohou tyto sloučeniny vyskytovat i v odpadní vodě. Jako vzorek byla použita voda z Ústřední čističky odpadních vod v Praze.

S narůstající délkou perfluorovaného řetězce dané kyseliny klesala účinnost SPE prekoncentrace, přičemž se pohybovala v rozmezí 51 až 102 %. Naopak obecně citlivost měření s prodlužujícím se perfluorovaným řetězcem dané kyseliny narůstala. Limity detekce jednotlivých kyselin se pohybovaly v rozmezí 6 až  $21 \text{ pg mL}^{-1}$ , s výjimkou PFNA, kde byl dosažen  $\text{LOD} = 1 \text{ pg mL}^{-1}$ . Tato kyselina poskytovala nejvyšší odezvosvý faktor, zvolená metoda se proto pro tuto látku jeví jako nejcitlivější.

Ve vzorcích přítokové a odtokové vody byly nalezeny a stanoveny příslušné kyseliny. Nejvyšší koncentrace v přítokové vodě byla stanovena u PFOA ( $78 \text{ pg mL}^{-1}$ ), následovaná PFNA ( $63 \text{ pg mL}^{-1}$ ). Pod limitem kvantifikace se nacházely PFDA, PFUnA a PFDoA, přičemž PFHxA a PFHpA nebyly vůbec detekovány. Ve vzorcích odtokové vody se kyseliny s délkou perfluorovaného řetězce  $C < 8$  vyskytovaly pod limitem detekce, naopak kyseliny s  $C \geq 8$  byly přítomny v koncentračním rozsahu od 39 do  $101 \text{ pg mL}^{-1}$ , s nejvyšší dosaženou koncentrací u PFDoA. Celkově nejnižší koncentrace stanovená ve vzorcích odpadní vody byla zaznamenána u PFOA v odtokové vodě ( $39 \text{ pg mL}^{-1}$ ).

Stanovením nalezených perfluorovaných kyselin v odpadní vodě nebylo možné jasné potvrdit, zda je Ústřední čistička odpadních vod možným zdrojem kontaminace vody perfluorovanými kyselinami, neboť vzorky přítokové a odtokové vody nebyly odebrány ve stejnou dobu. Ovšem až na PFOA byly koncentrace nalezených perfluorovaných kyselin v odtokové vodě vyšší než v přítokové.

## 6. Literatura

- [1] Giesy, J. P.; Kannan, K.:  
Perfluorochemical surfactants in the environment,  
*Environmental Science & Technology*, 36, 146A-152A (2002)
- [2] Yamashita, N.; Kannan, K.; Taniyasu, S.; Horii, Y.; Petrick, G.; Gamo, T.:  
A global survey of perfluorinated acids in oceans,  
*Marine Pollution Bulletin*, 51, 658-668 (2005)
- [3] Lindstrom, A. B.; Strynar, M. J.; Libelo, E. L.:  
Polyfluorinated compounds: past, present, and future,  
*Environmental Science & Technology*, 45, 7954-7961 (2011)
- [4] Ohya, T.; Kudo, N.; Suzuki, E.; Kawashima, Y.:  
Determination of perfluorinated carboxylic acids in biological samples by  
high-performance liquid chromatography,  
*Journal of Chromatography B*, 720, 1-7 (1998)
- [5] Dufková, V.; Čabala, R.; Ševčík, V.:  
Determination of C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub> perfluoroalkyl carboxylic acids in river water samples  
in the Czech Republic by GC-MS after SPE preconcentration,  
*Chemosphere*, 87, 463-469 (2012)
- [6] Prevedouros, K.; Cousins, I. T.; Buck, R. C.; Korzeniowski, S. H.:  
Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates,  
*Environmental Science & Technology*, 40, 32-44 (2006)
- [7] Kissa, E.:  
*Fluorinated Surfactants and Repellents*. 2nd ed. New York,  
Marcel Dekker (2001)
- [8] Liu, W.-L.; Hwang, B.-H.; Li, Z.-G.; Jen, J.-F.; Lee, M.-R.:  
Headspace solid phase microextraction in-situ supercritical fluid extraction coupled  
to gas chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous determination  
of perfluorocarboxylic acids in sediments,  
*Journal of Chromatography A*, 1218, 7857-7863 (2011)
- [9] Hinderliter, P. M.; DeLorme, M. P.; Kennedy, G. L.:  
Perfluorooctanoic acid: Relationship between repeated inhalation exposures and  
plasma PFOA concentration in the rat,  
*Toxicology*, 222, 80-85 (2006)

- [10] Ellis, D. A.; Martin, J. W.; De Silva, A. O.; Mabury, S. A.; Hurley, M. D.; Sulbaek Andersen, M. P.; Wallington, T. J.:  
Degradation of fluorotelomer alcohols: A likely atmospheric source of perfluorinated carboxylic acids,  
*Environmental Science & Technology*, 38, 3316-3321 (2004)
- [11] Hori, H.; Yamamoto, A.; Hayakawa, E.; Taniyasu, S.; Yamashita, N.; Kutsuna, S.; Kiatagawa, H.; Arakawa R.:  
Efficient decomposition of environmentally persistent perfluorocarboxylic acids by use of persulfate as a photochemical oxidant,  
*Environmental Science & Technology*, 39, 2383-2388 (2005)
- [12] Martin, J. W.; Smithwick, M. M.; Braune, B. M.; Hoekstra, P. F.; Muir, D. C. G.; Mabury, S. A.:  
Identification of long-chain perfluorinated acids in biota from the Canadian Arctic,  
*Environmental Science & Technology*, 38, 373-380 (2004)
- [13] Kudo, N.; Suzuki, E.; Katakura, M.; Ohmori, K.; Noshiro, R.; Kawashima, Y.:  
Comparison of the elimination between perfluorinated fatty acids with different carbon chain length in rats,  
*Chemico-Biological Interactions*, 134, 203-216 (2001)
- [14] Jahnke, A.; Berger, U.; Ebinghaus, R.; Temme, C.:  
Latitudinal gradient of airborne polyfluorinated alkyl substances in the marine atmosphere between Germany and South Africa (53°N-33°S),  
*Environmental Science & Technology*, 41, 3055-3061 (2007)
- [15] Stock, N. L.; Furdui, V. I.; Muir, D. C. G.; Mabury, S. A.:  
Perfluoroalkyl contaminants in the Canadian Arctic: Evidence of atmospheric transport and local contamination,  
*Environmental Science & Technology*, 41, 3529-3536 (2007)
- [16] Taves, D. R.:  
Evidence that there are two forms of fluoride in human serum,  
*Nature*, 217, 1050-1051 (1968)
- [17] Hansen, K. J.; Clemen, L. A.; Ellefson, M. E.; Johnson, H. O.:  
Compound-specific, quantitative characterization of organic fluorochemicals in biological matrices,  
*Environmental Science & Technology*, 35, 766-770 (2001)

- [18] Yamashita, N., Kannan, K., Taniyasu, S., Horii, Y., Okazawa, T., Petrick, G., Gamo, T.:  
Analysis of perfluorinated acids at parts-per-quadrillion levels in seawater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Environmental Science & Technology*, 38, 5522-5528 (2004)
- [19] Kannan, K., Corsolini, S., Falandysz, J., Oehme, G., Focardi, S., Giesy, J. P.:  
Perfluorooctanesulfonate and related fluorinated hydrocarbons in marine mammals, fishes, and birds from coasts of the Baltic and the Mediterranean seas, *Environmental Science & Technology*, 36, 3210-3216 (2002)
- [20] Yeung, L. W. Y.; Yamashita, N.; Taniyasu, S.; Lam, P. K. S.; Sinha, R. K.; Borole, D. V.; Kannan, K.:  
A survey of perfluorinated compounds in surface water and biota including dolphins from the Ganges River and in other waterbodies in India, *Chemosphere*, 76, 55-62 (2009)
- [21] Kannan, K.; Choi, J.-W.; Iseki, N.; Senthilkumar, K.; Kim, D. H.; Masunaga, S.; Giesy, J. P.:  
Concentrations of perfluorinated acids in livers of birds from Japan and Korea, *Chemosphere*, 49, 225-231 (2002)
- [22] Ikeda, T.; Aiba, K.; Fukuda, K.; Tanaka, M.:  
The induction of peroxisome proliferation in rat-liver by perfluorinated fatty-acids, metabolically inert derivatives of fatty-acids, *Journal of Biochemistry*, 98, 475-482 (1985)
- [23] Kawashima, Y.; Kobayashi, H.; Miura, H.; Kozuka H.:  
Characterization of hepatic responses of rat to administration of perfluorooctanoic and perfluorodecanoic acids at low levels, *Toxicology*, 99, 169-178 (1995)
- [24] Van Rafelghem, M. J.; Inhorn, S. L.; Peterson, R. E.:  
Effects of perfluorodecanoic acid on thyroid status in rats, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 87, 430-439 (1987)
- [25] Wigler, P. W.; Shah, Y. B.:  
Perfluorodecanoic acid inactivation of a channel for 2-aminopurine in the L5178Y cell membrane and recovery of the channel, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 85, 456-463 (1986)

- [26] Upham, B. L.; Deocampo, N. D.; Wurl B.; Trosko J. E.:  
Inhibition of gap junctional intercellular communication by perfluorinated fatty acids is dependent on the chain length of the fluorinated tail,  
*International Journal of Cancer*, 78, 491-495 (1998)
- [27] Liu, R. C. M.; Hahn, C.; Hurtt, M. E.:  
The direct effect of hepatic peroxisome proliferators on rat Leydig cell function *in vitro*,  
*Fundamental and Applied Toxicology*, 30, 102-108 (1996)
- [28] Martin, J. W.; Mabury, S. A.; O'Brien, P. J.:  
Metabolic products and pathways of fluorotelomer alcohols in isolated rat hepatocytes,  
*Chemico-Biological Interactions*, 155, 165-180 (2005)
- [29] Kudo, N.; Kawashima, Y.:  
Toxicity and toxicokinetics of perfluorooctanoic acid in humans and animals,  
*The Journal of Toxicological Sciences*, 28, 49-57 (2003)
- [30] Trojanowicz, M.; Wójcik, L.; Musijowski, J.; Koc, M.; Poboży, E.; Król, E.:  
New analytical methods developed for determination of perfluorinated surfactants in waters and wastes,  
*Croatica Chemica Acta*, 84, 439-446 (2011)
- [31] de Voogt, P.; Sáez, M.:  
Analytical chemistry of perfluoroalkylated substances,  
*Trends in Analytical Chemistry*, 25, 326-342 (2006)
- [32] Gołębowski, M.; Siedlecka, E.; Paszkiewicz, M.; Brzozowski, K.; Stepnowski, P.:  
Perfluorocarboxylic acids in cell growth media and technologically treated waters: Determination with GC and GC-MS,  
*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54, 577-581 (2011)
- [33] Boulanger, B.; Vargo, J. D.; Schnoor, J. L.; Hornbuckle, K. C.:  
Evaluation of perfluorooctane surfactants in a wastewater treatment system and in a commercial surface protection product,  
*Environmental Science & Technology*, 39, 5524-5530 (2005)
- [34] Sinclair, E.; Kannan, K.:  
Mass loading and fate of perfluoroalkyl surfactants in wastewater treatment plants,  
*Environmental Science & Technology*, 40, 1408-1414 (2006)



- [35] Schultz, M. M.; Barofsky, D. F.; Field, J. A.:  
Quantitative determination of fluorinated alkyl substances by  
large-volume-injection liquid chromatography tandem mass  
spectrometry – characterization of municipal wastewaters,  
*Environmental Science & Technology*, 40, 289-295 (2006)
- [36] Schultz, M. M.; Higgins, C. P.; Huset, C. A.; Luthy, R. G.; Barofsky, D. F.;  
Field, J. A.:  
Fluorochemical mass flows in a municipal wastewater treatment facility,  
*Environmental Science & Technology*, 40, 7350-7357 (2006)
- [37] Berger, U.; Järnberg, U.; Kallenborn, R.:  
Perfluorinated alkylated substances (PFAS) in the European Nordic environment,  
*Organohalogen Compounds*, 66, 4046-4052 (2004)
- [38] Ahrens, L.; Felizeter, S.; Sturm, R.; Xie, Z.; Ebinghaus, R.:  
Polyfluorinated compounds in waste water treatment plant effluents and surface  
waters along the River Elbe, Germany,  
*Marine Pollution Bulletin*, 58, 1326-1333 (2009)
- [39] Bossi, R.; Strand, J.; Sortkjær, O.; Larsen, M. M.:  
Perfluoroalkyl compounds in Danish wastewater treatment plants and  
aquatic environments,  
*Environment International*, 34, 443-450 (2008)
- [40] Loganathan, B. G.; Sajwan, K. S.; Sinclair, E.; Kumar, K. S.; Kannan, K.:  
Perfluoroalkyl sulfonates and perfluorocarboxylates in two wastewater  
treatment facilities in Kentucky and Georgia,  
*Water Research*, 41, 4611-4620 (2007)
- [41] Zhao, X.; Cai, Y.; Wu, F.; Pan, Y.; Liao, H.; Xu, B.:  
Determination of perfluorinated compounds in environmental water samples  
by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass  
spectrometry using surfactant – coated  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  magnetic nanoparticles as adsorbents,  
*Microchemical Journal*, 98, 207-214 (2011)
- [42] Lin, A. Y.-C.; Panchangam, S. C.; Ciou, P.-S.:  
High levels of perfluorochemicals in Taiwan's wastewater treatment plants and  
downstream rivers pose great risk to local aquatic ecosystems,  
*Chemosphere*, 80, 1167-1174 (2010)

- [43] Dufková, V.; Čabala, R.; Maradová, D.; Štícha, M.:  
A fast derivatization procedure for gas chromatographic analysis of  
perfluorinated organic acids,  
*Journal of Chromatography A*, 1216, 8659-8664 (2009)
- [44] Taniyasu, S.; Kannan, K.; So, M. K.; Gulkowska, A.; Sinclair, E.; Okazawa, T.;  
Yamashita, N.:  
Analysis of fluorotelomer alcohols, fluorotelomer acids, and short- and long-chain  
perfluorinated acids in water and biota,  
*Journal of Chromatography A*, 1093, 89-97 (2005)